

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19246

研究課題名（和文）能動的遺伝子導入による革新的ノックイン技術の開発

研究課題名（英文）Development of innovative knock-in technology by active gene transfer

研究代表者

築山 智之（TSUKIYAMA, Tomoyuki）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授

研究者番号：60612132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9を始めとするゲノム編集技術により、これまでに様々な遺伝子改変動物が作られるようになってはいるものの、相同組換えによる大きなフラグメントのノックインは依然として効率が悪いことが知られている。本研究では、トランスポゾンあるいは内在性相同組換え機構を用い、「能動的」にゲノム挿入を行う革新的なノックイン手法を開発することを目的とした。本研究では、ノックイン効率を効率よく評価するための評価系を改良したのに加え、内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子、および内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために相乗的に働く因子のクローニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が所属する滋賀医科大学では、カニクイザルにおけるゲノム編集研究を積極的に推進しているが、サルを用いる場合、マウスのように単純に試行数を増やすことで効率の問題を回避することが倫理的に難しく、現状の効率ではノックイン実験は難しい状況である。もし効率よくノックインを誘導することが可能になれば、カニクイザルを含めた大動物のみならず、全てを置き換えるポテンシャルを秘めた意欲的な研究である。

研究成果の概要（英文）：Although CRISPR/Cas9 and other genome editing technologies have enabled the generation of a variety of genetically modified animals, knock-in of large fragments by homologous recombination is still inefficient. The aim of this study was to develop an innovative knock-in method for "active" genome insertion using transposons or endogenous homologous recombination mechanisms. In this study, we first improved an evaluation system to efficiently assess knock-in efficiency. Additionally, we cloned several genes known to work in the endogenous homologous recombination mechanism and factors that work synergistically to induce a state close to endogenous homologous recombination.

研究分野：発生工学

キーワード：遺伝子改変 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 を始めとするゲノム編集技術により、これまでに様々な遺伝子改変動物が作られるようになってはいるものの、相同組換えによる大きなフラグメントのノックインは依然として効率が悪いことが知られている。我々が所属する滋賀医科大学では、カニクイザルにおけるゲノム編集研究を積極的に推進しているが、サルを用いる場合、マウスのように単純に試行数を増やすことで効率の問題を回避するということが倫理的に難しく、現状の効率ではノックイン実験は難しい状況である。

現行のノックイン手法はいずれも、Cas9 による DNA の二本鎖切断 (Double Strand Break、DSB) の後に起きる DNA 修復機構を利用した「受動的」なものである。そのため、①相同性配向型修復 (Homology Directed Repair、HDR) でノックインされるか、②非相同性末端結合 (Non Homologous End Joining、NHEJ) による修復機構で塩基配列が挿入・欠失されるかは、確率的に進む。これが低効率性の大きな要因である。これまでに、①の効率を上げるため、②を阻害する様々な NHEJ 阻害剤が応用されたが、受精卵における応用で再現性のある報告は未だない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では発想を転換し、トランスポゾンあるいは内在性相同組換え機構を用い、「能動的」にゲノム挿入を行う革新的なノックイン手法を開発することを目的とした。

本研究では特に、トランスポゾンあるいは内在性相同組換え因子の内因性のヌクレアーゼ活性と NHEJ 阻害活性をそのままゲノム編集に応用するために、切断活性を持たない変異型 Cas9 である dCas9 と、トランスポゾンあるいは内在性相同組換え因子との融合タンパク質を構築し、それをゲノム編集に応用して、効率的なノックイン誘導法を確立しようと考えた。

さらに、その他の HDR 経路の関連タンパク質の強制発現や化学的阻害剤を駆使し、内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために、相乗的に働く因子の探索を行おうと考えた。

3. 研究の方法

まず、トランスポゾンの転移酵素、あるいは内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子のクローニングを行い、dCas9 との融合タンパク質を発現するベクターを構築した。

また、本研究では、トランスポゾンあるいは内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用することで高効率な遺伝子改変技術を確立することを目的としたが、その実現のためには効率的なノックインの評価系の確立が不可欠である。よって、ノックイン効率を効率よく評価するために、恒常的発現遺伝子あるいは初期胚で高発現している遺伝子の遺伝子座にレポーターをノックインする評価系の改良を試みた。

これらを組み合わせ、293 細胞、マウス ES 細胞、カニクイザル ES 細胞、マウス初期胚、カニクイザル初期胚において、ノックイン効率を検証した。また、その他の HDR 経路の関連タンパク質の強制発現や化学的阻害剤を用い、内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために相乗的に働く因子の探索を行った。

4. 研究成果

本研究では、ノックイン効率をいかに効率よく評価するかが極めて重要となる。そこで恒常的発現遺伝子あるいは初期胚で高発現している遺伝子の遺伝子座にレポーターをノックインする評価系の改良を行った。

評価系は 293 細胞、マウス ES 細胞、カニクイザル ES 細胞、マウス初期胚、カニクイザル初期胚を用い、それぞれ構築した。

マウスでは、セーフハーバー遺伝子として知られている *ROSA26* 遺伝子座に加え、未分化細胞で高発現することが知られている *Pou5f1*(Oct3/4) 遺伝子座、恒常的に発現する *Rplp0* 遺伝子座にレポーターをノックインする評価系を改良した。

カニクイザルにおいては、セーフハーバー遺伝子として知られている *AAVS1* 遺伝子座に加え、マウスと同様、未分化細胞で高発現することが知られている *POU5F1*(OCT3/4) 遺伝子座、恒常的に発現する *RPLP0* 遺伝子座にレポーターをノックインする評価系を改良した。

なお、これらの他、目的に応じたレポーターを搭載した複数のベクターを構築した。

次に、トランスポゾン転移酵素、あるいは内在性の相同組換え機構において働くことが知られている複数の遺伝子のクローニングを行い、dCas9 との融合タンパク質を発現するベクターを構築した。

さらに、内在性の相同組換えに近い状態に誘導するために、相乗的に働く因子の探索を行い、それらの遺伝子のクローニングも行った。

これらの研究により、トランスポゾンあるいは内在性の相同組換え機構を用いて効率的にノックインを行うための基盤を整えた。今後、これらの基盤を用いてさらに研究を推進する予定である。

本研究では、トランスポゾンあるいは内在性の相同組換え機構に注目し、それをノックインに応用することで高効率な遺伝子改変技術を確立することを目的としたが、もし効率よくノックインを誘導することが可能になれば、カニクイザルを含めた大動物のみならず、全てを置き換えるポテンシャルを秘めた意欲的な研究である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takashima Satsuki, Okamura Eiichi, Ichiyama Yusuke, Nishi Kiyoto, Shimizu Akio, Watanabe Chisato, Muto Masanaga, Matsumoto Shoma, Tsukiyama-Fujii Setsuko, Tsukiyama Tomoyuki, Ogita Hisakazu, Nishi Eiichiro, Ohji Masahito, Sugiyama Fumihito, Takahashi Satoru, Mizuno Seiya, Mizutani Ken-ichi, Ema Masatsugu	4. 巻 73
2. 論文標題 Null mutation of exocyst complex component 3-like does not affect vascular development in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 93~100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.23-0105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Akira, Tsukiyama Tomoyuki, Komeno Masahiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kawamoto Ikuo, Murase Mitsuru, Nakagawa Takahiro, Itagaki Iori, Seita Yasunari, Matsumoto Shoma, Nakaya Masataka, Shimizu Akio, Yamada Atsushi, Ema Masatsugu, Ogita Hisakazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Generation of a familial hypercholesterolemia model in non-human primate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-42763-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Gyobu Motani Sayuri, Yabuta Yukihiro, Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Okamoto Ikuhiro, Kawasaki Masanori, Kitamura Ayaka, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Tsujimura Taro, Yamamoto Takuya, Nakamura Tomonori, Saitou Mitinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022112962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Chisato, Shibuya Hiroto, Ichiyama Yusuke, Okamura Eiichi, Tsukiyama-Fujii Setsuko, Tsukiyama Tomoyuki, Matsumoto Shoma, Matsushita Jun, Azami Takuya, Kubota Yoshiaki, Ohji Masahito, Sugiyama Fumihiro, Takahashi Satoru, Mizuno Seiya, Tamura Masaru, Mizutani Ken-ichi, Ema Masatsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Essential Roles of Exocyst Complex Component 3-like 2 on Cardiovascular Development in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1730 ~ 1730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12111730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hikiyama Ryota, Morimura Toshifumi, Ayaki Takashi, Tsukiyama Tomoyuki, Morimura Naoko, Kusui Makiko, Wada Hideki, Minamiyama Sumio, Shodai Akemi, Asada-Utsugi Megumi, Muramatsu Shin-ichi, Ueki Takatoshi, Takahashi Ryosuke, Urushitani Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Conformational change of RNA-helicase DHX30 by ALS/FTD-linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-20405-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Nakakita Baku, Kishine Aoi, Nosaka Yoshiaki, Saito Saki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kawamoto Ikuo, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nagano Masahiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiko, Horie Akihito, Mandai Masaki, Ohta Hiroshi, Saitou Mitinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022110815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 築山 智之
2. 発表標題 遺伝子改変力ニクイザルの作出
3. 学会等名 革新脳分科会The Final (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 築山 智之
2. 発表標題 遺伝子改変カニクイザルの作出
3. 学会等名 日本受精着床学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中家 雅隆, 築山 智之
2. 発表標題 piggyBacトランスポゾンシステムを介した非ヒト霊長類トランスジェニック動物の作出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakaya M. and Tsukiyama T.
2. 発表標題 Generating transgenic non-human primates via the piggyBac transposon system.
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中家 雅隆, 築山 智之
2. 発表標題 piggyBacトランスポゾンシステムを利用したトランスジェニックカニクイザルの作出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------